

氏 名（本籍）	藤 広 覚（岐阜県）
学位の種類	博士（学術）
学位記番号	甲第23号
学位授与年月日	平成20年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	<i>Trametes versicolor</i> 産生ラッカーゼアイソフォームの分子多様性と環境 汚染化学物質代謝性
論文審査委員	（主査） 其 木 茂 則 （副査） 佐 俣 哲 郎 鈴 木 潤

論 文 内 容 の 要 旨

物理化学的環境汚染対策技術に対して、生物の持つ代謝機能を利用して汚染された環境の修復を目指す技術は、バイオレメディエーションと呼ばれ、低コストで環境負荷が小さいなどの利点があると考えられている。樹木の構成成分であるリグニンをリグニン分解系酵素と呼ばれる酵素群により酸化分解し、エネルギーとして利用している白色腐朽菌は、その化学構造がリグニンと類似している難分解性有機汚染物質に対しても代謝活性を有していることから、バイオレメディエーションに白色腐朽菌を利用した報告が数多くなされている。しかし複数種類存在するリグニン分解系酵素の中で、有機汚染物質の代謝との関連を詳しく検討した報告は少ない。よって、本研究ではリグニン分解系酵素の中でも特に多くのアイソフォームが存在し、様々な化学物質に対する代謝活性が期待できるラッカーゼに注目し、白色腐朽菌 *Trametes versicolor* が産生するラッカーゼアイソフォーム遺伝子のクローニングと、麹菌を利用した高タンパク質発現系を用いて発現させたラッカーゼアイソフォームによる環境汚染物質代謝性について検討した。

NCBI データベース上の *T. versicolor* 由来の8種類のラッカーゼ遺伝子を、それらの相同性により4つのグループ（Lac1 遺伝子、Lac2 遺伝子、Lac3 遺伝子および Lac4 遺伝子）に分け、これらをクローニングするための4対のプライマーを作製した。*T. versicolor* の RNA を鋳型として RT-PCR を行った結果、4種類の遺伝子に相当すると考えられる 1.5 kbp 付近のバンド完全長 cDNA を獲得した。4種類の遺伝子の塩基配列を比較したところ、互いの相同性は 75 % 以下となった。NCBI データベースに登録されている他の *T. versicolor* 由来のラッカーゼ遺伝子との比較では塩基配列で数十塩基、アミノ酸配列で数アミノ酸が異なっていたが、これらの遺伝子はラッカーゼ特有の4か所の銅原子結合部位を保存していることが確認された。同定したこれら4種類のラッカーゼ遺伝子を、新規に DDBJ に登録した。これらの遺伝子を大腸菌 BL21 株および小麦胚芽無細胞タンパク質発現系にて発現させたところ、SDS-

PAGEでバンドは確認したものの、ラッカーゼとしての活性は認められなかった。この結果は、タンパク質の翻訳後修飾の不足によってもたらされたものと考え、続いて麹菌での発現に取り組んだ。

麹菌 *Aspergillus oryzae* による組換えタンパク質発現系は、大腸菌など原核生物を使った系と違い翻訳後修飾が可能であり、なおかつ *A. oryzae* はラッカーゼを内在しない。獲得した4種類のラッカーゼ遺伝子を *A. oryzae* に導入した結果、ラッカーゼの基質の一つである ABTS を酸化してラッカーゼ活性を示す形質転換体を獲得した。以降の研究は、研究に必要な量の酵素が獲得できた Lac1 および Lac4 について行った。形質転換 *A. oryzae* の培養液から陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した酵素を等電点電気泳動で解析した結果、Lac1 は等電点 4.0 を最大値とする複数バンドを、Lac4 は 3.6 のユニークバンドを示した。Lac1 および Lac4 の酵素反応速度論的解析の結果、非フェノール性化合物である ABTS を基質とした場合、酵素と基質の親和性を表すミカエリス定数 (K_m) は、Lac1 が $13.56 \mu\text{M}$ 、Lac4 が $20.17 \mu\text{M}$ となり、 k_{cat}/K_m で表される反応性は、Lac1 が 0.69 M/sec 、Lac4 が 0.44 M/sec となり、Lac1 の方が反応性が高かった。これに対して、フェノール性化合物であるシリングアルダジンを基質とした場合、 K_m は Lac1 が $93.92 \mu\text{M}$ 、Lac4 が $12.35 \mu\text{M}$ となり、 k_{cat}/K_m で表される反応性は、Lac1 が 0.39 M/sec 、Lac4 が 0.74 M/sec となり、Lac4 の方が反応性が高かった。また、フェノール性基質であるグアヤコールに対しては他の基質と比較して親和性、反応性共に乏しいことが判明した。

エストロゲン作用等を示す内分泌かく乱物質の一つである6種類の水酸化PCBの試験管内代謝試験 (1U相当の酵素と水酸化PCB各 53 pmol を 37°C 、1時間反応) では、全ての異性体に対して分解性を示した。試験に供した2種類の4塩素化水酸化PCBのうち、4-OH-2',3,5,5'-TeCBに対してはLac4 (72.7%) の方がLac1 (59.9%) よりも分解性が高く、4-OH-2',3',4',5'-TeCBに対してはLac1 (34.2%) の方がLac4 (18.2%) よりも分解性が高く、塩素の置換位置のみが異なる異性体間で、アイソフォームごとに分解性が異なった。また両アイソフォーム共に、4-OH-2',3',4',5'-TeCBよりも4-OH-2',3,5,5'-TeCBをより高度に分解することが判明した。さらに、2塩素化水酸化PCB、5塩素化水酸化PCBおよび6塩素化水酸化PCBではLac1とLac4ではほぼ同様の代謝率となった。同じく内分泌かく乱作用のあるビスフェノールAの試験管内代謝試験 (1 U相当の酵素とビスフェノールA $0.22 \mu\text{mol}$ を 37°C 、1時間反応) の結果、Lac1は分解率97.7%とほぼ全量を分解したのに対し、Lac4による分解率は21.0%であった。さらに、Lac1およびLac4のビスフェノールAに対する k_{cat}/K_m は、Lac1がLac4の約2倍の値であることが判明した。

また、ラッカーゼと5塩素化水酸化PCBの反応から、高速液体クロマトグラフィーにより2種類の中間代謝物が分離され、そのうちの一方は水酸基を介してC-O結合した二量体であり、他方は、ベンゼン環同士がC-C結合した二量体であることが初めて示唆された。

本研究では、*T. versicolor* 産生のラッカーゼアイソフォームのクローニングと、水酸化PCBやビスフェノールAに対する代謝性を初めて明らかにした。

論文審査の結果の要旨

物理化学的環境汚染対策技術に対して、生物の持つ代謝機能を利用して汚染された環境の修復を目指す技術は、バイオレメディエーションと呼ばれ、低コストで環境負荷が小さいなどの利点に期待がもたれている。一方、樹木の構成成分であるリグニンをリグニン分解系酵素と呼ばれる酵素群により酸化分解し、エネルギーとして利用している白色腐朽菌は、その化学構造がリグニンと類似している難分解性有機汚染物質に対しても代謝活性を有していることから、バイオレメディエーションに白色腐朽菌を利用した報告が数多くなされてきた。しかし複数種類存在するリグニン分解系酵素間で、有機汚染物質の代謝性を詳しく比較検討した報告は少ない。よって、本研究ではリグニン分解系酵素の中でも特に多くのアイソフォームが存在し、様々な化学物質に対する代謝活性が期待できるラッカーゼに注目し、白色腐朽菌 *Trametes versicolor* が産生するラッカーゼアイソフォーム遺伝子のクローニングと、麹菌を利用した高タンパク質発現系を用いて発現させたラッカーゼアイソフォームによる環境汚染物質代謝性について検討した。

NCBI データベース上の *T. versicolor* 由来の8種類のラッカーゼ遺伝子を、それらの相同性により4つのグループ (Lac1 遺伝子、Lac2 遺伝子、Lac3 遺伝子および Lac4 遺伝子) に分け、これらをクローニングするための4対のプライマーを作製した。*T. versicolor* のRNAを鋳型としてRT-PCRを行った結果、4種類の遺伝子に相当すると考えられる1.5 kbp 付近の完全長cDNAを獲得した。これら4種類の遺伝子の塩基配列を比較したところ、互いの相同性は75%以下となった。NCBI データベースに登録されている他の *T. versicolor* 由来のラッカーゼ遺伝子との比較では塩基配列で数十塩基、アミノ酸配列で数アミノ酸が異なっていたが、これらの遺伝子はラッカーゼ特有の4か所の銅原子結合部位を保存していることが確認され、新規にラッカーゼ遺伝子としてDDBJに登録した。これらの遺伝子を大腸菌 BL21 株および小麦胚芽無細胞タンパク質発現系にて発現させたところ、SDS-PAGEでタンパク質バンドは確認できたものの、ラッカーゼとしての活性は認められなかった。この結果は、タンパク質の翻訳後修飾の不足によってもたらされたものと考え、続いて麹菌での発現に取り組んだ。

麹菌 *Aspergillus oryzae* による組換えタンパク質発現系は、大腸菌など原核生物を使った系と違い翻訳後修飾が可能であり、なおかつ *A. oryzae* はラッカーゼを内在しない。獲得した4種類のラッカーゼ遺伝子を *A. oryzae* に導入した結果、ラッカーゼの基質の一つであるABTSを酸化してラッカーゼ活性を示す形質転換体が獲得できた。以降の研究は、研究に必要な量の酵素が獲得できたLac1およびLac4について行った。形質転換 *A. oryzae* の培養液から陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した酵素を等電点電気泳動で解析した結果、Lac1は等電点4.0を最大値とする複数バンドを、Lac4は3.6の単一バンドを示した。Lac1およびLac4の酵素反応速度論的解析の結果、非フェノール性化合物であるABTSを基質とした場合、酵素と基質の親和性を表すミカエリス定数 (K_m) は、Lac1が13.56 μM 、Lac4が20.17 μM となり、ABTSに対する親和性はLac1の方が高く、また k_{cat}/K_m で表される反応性も、Lac1が0.69 M/sec、Lac4が0.44 M/secとなり、Lac1の方が高かった。これに対して、フェノール性化合物であるシリングアルダジンを基質とした場合、 K_m はLac1が93.92 μM 、Lac4が12.35 μM となり、シリ

ングアルダジンに対する親和性はLac4の方が高く、 k_{cat}/K_m で表される反応性も、Lac1が0.39 M/sec、Lac4が0.74 M/secとなり、Lac4の方が高かった。また、フェノール性基質であるグアヤコールに対しては他の基質と比較して親和性、反応性共に低かった。

エストロゲン作用等を示す内分泌かく乱物質の一つである6種類の水酸化PCBの試験管内代謝試験（1Uの酵素と水酸化PCB各53 pmolを37℃、1時間反応）では、全ての同族体に対して代謝性を示した。試験に供した2種類の4塩素化水酸化PCBのうち、4-OH-2',3,5,5'-TeCBに対してはLac4（72.7%）の方がLac1（59.9%）よりも代謝性が高く、しかし、4-OH-2',3',4',5'-TeCBに対してはLac1（34.2%）の方がLac4（18.2%）よりも代謝性が高く、塩素の置換位置のみが異なる異性体間で、アイソフォームごとに代謝性が異なる結果が得られた。また両アイソフォーム共に、4-OH-2',3',4',5'-TeCBよりも4-OH-2',3,5,5'-TeCBをより高度に代謝することが判った。さらに、2塩素化水酸化PCB、5塩素化水酸化PCBおよび6塩素化水酸化PCBに対しては、Lac1、Lac4共に同様の代謝性を示した。同じく内分泌かく乱作用のあるビスフェノールAの試験管内代謝試験（1Uの酵素とビスフェノールA 0.22 μ molを37℃、1時間反応）の結果、Lac1は97.7%とほぼ全量を代謝したのに対し、Lac4による代謝率は21.0%であった。さらに、Lac1およびLac4のビスフェノールAに対する k_{cat}/K_m はLac1がLac4の約2倍の値であり、Lac1の方がビスフェノールAに対して反応性が高かった。

また、ラッカーゼと5塩素化水酸化PCBの反応から、高速液体クロマトグラフィーにより2種類の中間代謝物が分離され、そのうちの一方は水酸基を介してC-O結合した二量体であり、他方は、ベンゼン環同士がC-C結合した二量体であることが初めて示唆された。

本研究では、*T. versicolor* 産生のラッカーゼアイソフォームのクローニングと、各アイソフォーム間の水酸化PCBやビスフェノールAに対する代謝性の違いを初めて明らかにした。

以上のように、本研究は難分解性有機化学物質による環境汚染に対するバイオレメディエーションのこれからの進展に寄与するところ大であり、博士（学術）の学位を授与するに値するものと審査員一同認めた。